

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
18. September 2003 (18.09.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/076654 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68

[CZ/CZ]; Cervinkova 15, 61200 Brno (CZ). KOSAK,  
Hans [DE/DE]; Lisztstr. 15, 53115 Bonn (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/02202

(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstr. 49 A,  
91052 Erlangen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
4. März 2003 (04.03.2003)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 10 100.0 8. März 2002 (08.03.2002) DE  
102 27 042.2 17. Juni 2002 (17.06.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT  
GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN  
[DE/DE]; Ulrich-Schalk-Str. 3a, 91056 Erlangen (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PALECEK, Emil

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING, QUANTIFYING AND/OR CHARACTERIZING AN ANALYTE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEISEN, QUANTIFIZIEREN UND/ODER CHARAKTERISIEREN EINES  
ANALYTEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for identifying, quantifying and/or characterizing an analyte (10) contained in a first liquid. Said method is characterized by the following steps: a) bringing the analyte (10) into contact with a first probe (20) and with a second probe (22), each probe having an affinity to the analyte (20), and incubating the analyte. The affinity of the first probe (20) is effected by a specific affinity to at least one first binding site (12) of the analyte (20), and the incubating ensues under conditions under which the first probe (20) and the second probe (22) bind to the analyte (10). Other steps include: b) marking the first probe (20) with at least one first marker (24) that can be identified in an electrochemically specific manner at least when the probe (22) cannot already be identified in an electrochemically specific manner; c) marking the second probe (22) with at least one second marker (26) that can be identified in an electrochemically specific manner at least when this probe cannot already be identified in an electrochemically specific manner; d) separating the first probe (20) and second probe (22) that are bound to the analyte (10); e) detecting a first electrochemical signal Si1, which is caused by the separated first probe (20) or by the first marker (24) and detecting a second electrochemical signal Si2 caused by the separated second probe (22) or by the second marker (26), and; f) identifying, quantifying and/or characterizing the analyte (10) by using a ratio between the first Si1 and the second signal Si2.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweisen, Quantifizieren und/oder Charakterisieren eines in einer ersten Flüssigkeit enthaltenen Analyten (10) mit folgenden Schritten: a) Inkontaktbringen und Inkubieren des Analyten (10) mit jeweils einer eine Affinität zu dem Analyten (10) aufweisenden ersten (20) und zweiten Sonde (22), wobei die Affinität der erste Sonde (20) durch eine spezifische Affinität zu mindestens einer ersten Bindungsstelle (12) des Analyten (10) bewirkt wird und das Inkubieren unter Bedingungen erfolgt, unter denen die erste (20) und die zweite Sonde (22) an den Analyten (10) binden, b) Markieren der ersten Sonde (20) durch mindestens einen elektrochemisch spezifisch nachweisbaren ersten Marker (24), zumindest wenn sie nicht bereits elektrochemisch spezifisch nachweisbar ist, c) Markieren der zweiten Sonde (22) durch mindestens einen elektrochemisch spezifisch nachweisbaren zweiten Marker (26), zumindest wenn sie nicht bereits elektrochemisch spezifisch nachweisbar ist, d) Absondern der an den Analyten (10) gebundenen ersten (20) und zweiten Sonde (22), e) Detektion eines durch die abgesonderte erste Sonde (20) oder den ersten Marker (24) verursachten ersten elektrochemischen Signals Si1 und eines durch die abgesonderte zweite Sonde (22) oder den zweiten Marker (26) verursachten zweiten elektrochemischen Signals Si2 und f) Nachweisen, Quantifizieren und/oder Charakterisieren des Analyten (10) mittels eines Verhältnisses zwischen dem ersten Si1 und dem zweiten Signal Si2.



**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

## Verfahren zum Nachweisen, Quantifizieren und/oder Charakterisieren eines Analyten

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweisen, Quantifizieren und/oder Charakterisieren eines Analyten in einer Flüssigkeit.

10 Aus Sawada, K. et al. (2000), Analytical Biochemistry 286, Seiten 59 bis 66 ist ein Verfahren zum Nachweis einer Triplet-Ausdehnung bekannt. Das Verfahren beruht auf dem Nachweis der Triplet-Ausdehnung im Patientengenom durch Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Sonde. Die Sonde wird für eine Southern-Hybridisierung eingesetzt. Gebundene  
15 Sonde wird durch Bindung eines mit alkalischer Phosphatase markierten Anti-Digoxigenin-Fab-Fragments und anschließendem Nachweis der alkalischen Phosphatase durch eine Chemilumineszenz-Reaktion detektiert. Die Zahl der Triplet-Wiederholungen wird aus der Intensität des dabei erzeugten Signals auf Grund  
20 eines linearen Zusammenhangs zwischen der Intensität und der Anzahl der Triplet-Wiederholungen abgeschätzt. Nachteilig bei diesem Verfahren ist, dass es nicht besonders sensitiv und durch die vielen Verfahrensschritte - 1. Bindung der Sonde, 2. Bindung des Antikörpers, 3. Nachweis des Antikörpers durch  
25 Enzymreaktion - verhältnismäßig störanfällig ist.

Ein weiteres Verfahren zum Nachweisen einer ausgedehnten Nukleotidwiederholung in genomischer DNA ist aus der US  
5,695,933 A bekannt. Dabei wird isolierte genomische DNA mit  
30 miteinander ligierbaren und zur Nukleotidwiederholung komplementären Oligonukleotiden in Kontakt gebracht, so dass eine Hybridisierung stattfindet. Die hybridisierten Oligonukleotide werden miteinander ligiert, so dass ein Multimer der hybridisierten Oligonukleotide entsteht. Die genomische DNA  
35 wird von dem damit hybridisierten Multimer durch Denaturie-

5      rung getrennt. Anschließend wird die Hybridisierung und die  
Ligation solange wiederholt, bis man eine für eine Detektion  
ausreichende Menge an Multimeren erzeugt hat. Bei dem Verfah-  
ren können auch unterschiedliche Oligonukleotide eingesetzt  
10      werden. Nachteilig ist dabei, dass die ausgedehnten Nukleo-  
tidwiederholungen nur durch die Länge der gebildeten Multime-  
re nachgewiesen werden können. Dazu ist eine gelelektrophore-  
tische Analyse der Multimere erforderlich. Dadurch ist das  
Verfahren verhältnismäßig aufwändig.

10

15      Mit elektrochemischen Verfahren können redoxaktive Analyte  
untersucht und spezifiziert werden. Die Umsetzung der Analyte  
findet an einer Arbeitselektrode statt. Zur stromlosen Mes-  
sung der Spannung wird eine Referenzelektrode verwendet. Der  
über die Arbeitselektrode fließende Strom oder die Spannung,  
welche zwischen der Arbeits- und der Referenzelektrode ab-  
fällt, wird über eine Gegenelektrode gesteuert. Die elektro-  
chemische Detektion von Analyten kann potentiometrisch oder  
amperometrisch erfolgen. In einem potentiometrischen Messpro-  
20      tokoll wird die über der Arbeits- und Referenzelektrode ab-  
fallende Spannung zeitabhängig gemessen. Während dieser Mes-  
sung kann ein kontrollierter Stromverlauf angelegt werden. Im  
Falle eines konstanten Stroms wird diese Messung als Kon-  
stantstrom-Chronopotentiometrie bezeichnet. Die Untersuchung  
25      von an einer Arbeitselektrode adsorbierten oder komplexierten  
Analyten mittels Konstantstrom-Chronopotentiometrie wird auch  
als Konstantstrom-Potentiometrische-Stripping-Analyse (KSPSA)  
bezeichnet. Die Kathodische-Konstantstrom-Potentiometrische-  
Stripping-Analyse beinhaltet ein Verfahren in dem durch das  
30      Anlegen eines positiven Stromes sukzessive Analyte oxidiert  
werden. Aus diesen spannungsabhängigen Oxidationsreaktionen  
können Rückschlüsse auf oxidierbare Analyte gezogen werden.  
Die Anodische-Konstantstrom-Potentiometrische-Stripping-Ana-  
lyse beinhaltet ein Verfahren, bei dem ein negativer Strom

angelegt wird, um aus dem erhaltenen Spannungsverlauf Rückschlüsse auf reduzierbare Analyte schließen zu können.

5 In einem amperometrischen Messprotokoll wird die Spannung, welche zwischen der Referenz- und der Arbeitselektrode abfällt, über eine Gegenelektrode nach einem vorgegebenen Protokoll verändert. Gleichzeitig wird der Strom gemessen, welcher über die Arbeitselektrode fließt. Je nach angelegter Spannung können redoxaktive Analyte reduziert oder oxidiert  
10 werden. Durch eine Auswertung des Stromverlaufs können Rückschlüsse auf die Analyte gezogen werden. Ein elektrochemisches Messverfahren mit einer stationären Arbeitselektrode, in welchem eine Strom-Spannungskennlinie aufgenommen wird, wird auch als Voltammetrie und die zugehörige grafische Darstellung als Voltammogramm bezeichnet. Für sehr sensitive  
15 Messungen von Redoxprozessen wurden spezielle Messprotokolle entwickelt, bei welchen neben den Redoxprozessen stattfindende die Messung beeinflussende kapazitive Prozesse weit gehend unterdrückt werden. Ein sehr effizientes Messprotokoll ist  
20 die Differenzielle-Puls-Voltammetrie (DPV).

Aus der US 6,100,045 ist ein Verfahren zum Nachweisen eines Analyten bekannt. Dabei wird der Analyt mit einer redoxaktiven Substanz markiert und an eine feste Phase gebunden. Bei  
25 der festen Phase kann es sich um magnetische Mikropartikel handeln. Die feste Phase ist in der Nähe einer Elektrode angebracht. Mittels der redoxaktiven Markierung wird die Bindung des Analyten an die feste Phase als amperometrisches Signal über die Elektrode nachgewiesen. - Das bekannte Verfahren  
30 kann vor allem Informationen über das Vorhandensein des Analyten, kaum aber über dessen Eigenschaften liefern. Weiterhin ist es nicht besonders sensitiv. Zu dessen Durchführung ist eine relativ kompliziert aufgebaute Vorrichtung erforderlich.

Aus der US 5,871,918 A und der US 6,346,387 B1 ist es bekannt, einen Analyten, z. B. eine DNA, mit einer an eine Elektrode gebundenen Fänger-Sonde zu hybridisieren. Nach dem Inkontaktbringen des Analyten mit einer Reporter-Sonde erfolgt der elektrochemische Nachweis der Hybridisierung. Dazu werden die Basen einer Reporter-Sonde nach der Bindung an die Ziel-DNA mit Übergangsmetallkomplexen zu elektrochemisch nachweisbaren Markern umgesetzt. Dabei werden auch Basen der Ziel-DNA umgesetzt und erzeugen beim Nachweis ein elektrochemisches Signal. Das beschränkt die Nachweisempfindlichkeit dieses Verfahrens.

Aus Marrazza, G. et al. (2000), Clinical Chemistry 46:1, Seiten 31 bis 37 ist ein Verfahren zum elektrochemischen Nachweis von PCR-Produkten bekannt. Dabei wird eine an einer Elektrode immobilisierte Fänger-DNA mit PCR-amplifizierter DNA unter Hybridisierungsbedingungen in Kontakt gebracht. Die Hybridisierungsreaktion an der Elektrodenoberfläche wird durch chronopotentiometrische Stripping-Analyse unter Verwendung von Daunomycin als Indikator verfolgt. Nachteilig bei diesem Verfahren ist, dass es stets eine Kopplung der Fänger-DNA an die Elektrode erfordert und diese Elektrode dann nur zum Nachweis eines bestimmten Analyten geeignet ist.

Aus Authier et al., (2001), Anal. Chem. 73, Seiten 4450 bis 4456 ist es bekannt, eine Nukleinsäure als Ziel-DNA unspezifisch an einer inneren Oberfläche eines Gefäßes zu binden. Die Ziel-DNA wird mit einer mit einem Goldpartikel markierten Oligonukleotid als Reporter-Sonde hybridisiert. Die Reporter-Sonde wird elektrochemisch unter Verwendung von einmalig zu verwendenden Mikroband-Elektroden nachgewiesen. Dieses Verfahren hat zahlreiche Nachteile. Die Verwendung eines Gefäßes zum Binden der Ziel-DNA macht es unmöglich, die Ziel-DNA in einem kleinen Volumen zu konzentrieren. Das beschränkt die Nachweisempfindlichkeit. Weiterhin kann die unspezifische

Bindung von Substanzen, insbesondere der Reporter-Sonde, an die innere Oberfläche des Gefäßes zu einem hohen Hintergrundsignal und einer Wechselwirkung mit der elektrochemischen Detektion führen.

5

Aus der WO 93/20230 ist ein polarografisches elektrochemisches Verfahren zum Nachweis einer DNA-Hybridisierung bekannt. Bei diesem Verfahren wird eine Elektrode zunächst mit einzelsträngiger DNA in Kontakt gebracht und ein polarografisches Signal für diese einzelsträngige DNA gemessen. Anschließend wird eine Oligonukleotid-Sonde unter Hybridisierungsbedingungen hinzugefügt, überschüssiges Reagenz entfernt und ein polarografisches Signal ermittelt. Durch Vergleich der beiden ermittelten Signale kann festgestellt werden, ob es zu einer Hybridisierung gekommen ist. Mit dem Verfahren können nur wenige Informationen über die Eigenschaften der untersuchten DNA gewonnen werden.

Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein möglichst schnell und einfach durchführbares Verfahren mit hoher Sensitivität zum Nachweisen, Quantifizieren und/oder Charakterisieren eines Analyten angegeben werden. Das Charakterisieren kann dabei z. B. im Hinblick auf die Länge bzw. Größe des Analyten erfolgen.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 2 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 3 bis 33.

30

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweisen, Quantifizieren und/oder Charakterisieren eines in einer ersten Flüssigkeit enthaltenen Analyten mit folgenden Schritten vorgesehen:

35

- a) Inkontaktbringen und Inkubieren des Analyten mit jeweils einer Affinität zu dem Analyten aufweisenden ersten und zweiten Sonde, wobei die Affinität der ersten Sonde durch eine spezifische Affinität zu mindestens einer ersten Bindungs-  
5 stelle des Analyten bewirkt wird und das Inkubieren unter Bedingungen erfolgt, unter denen die erste und die zweite Sonde an den Analyten binden,
- b) Markieren der ersten Sonde durch mindestens einen elektrochemisch spezifisch nachweisbaren ersten Marker, zumindest wenn sie nicht bereits elektrochemisch spezifisch nachweisbar ist,  
10
- c) Markieren der zweiten Sonde durch mindestens einen elektrochemisch spezifisch nachweisbaren zweiten Marker, zumindest wenn sie nicht bereits elektrochemisch spezifisch nachweisbar ist,  
15
- d) Absondern der an den Analyten gebundenen ersten und zweiten Sonde,  
20
- e) Detektion eines durch die abgesonderte erste Sonde oder den ersten Marker verursachten ersten elektrochemischen Signals und eines durch die abgesonderte zweite Sonde oder den zweiten Marker verursachten zweiten elektrochemischen Signals und  
25
- f) Nachweisen, Quantifizieren und/oder Charakterisieren des Analyten mittels eines Verhältnisses zwischen dem ersten und dem zweiten Signal.  
30

Weiterhin ist ein Verfahren zum Nachweisen, Quantifizieren und/oder Charakterisieren eines in einer ersten Flüssigkeit enthaltenen Analyten mit folgenden Schritten vorgesehen:  
35

.....



- a) Inkontaktbringen und Inkubieren des Analyten mit jeweils einer Affinität zu dem Analyten aufweisenden ersten Sonde, wobei die Affinität der ersten Sonde durch eine spezifische Affinität zu mindestens einer ersten Bindungsstelle des Analyten bewirkt wird und das Inkubieren unter Bedingungen erfolgt, unter denen die erste Sonde an den Analyten bindet,
- b) Markieren der ersten Sonde durch mindestens einen elektrochemisch spezifisch nachweisbaren ersten Marker, zumindest wenn sie nicht bereits elektrochemisch spezifisch nachweisbar ist,
- c) Markieren des Analyten durch mindestens einen elektrochemisch spezifisch nachweisbaren zweiten Marker, zumindest wenn der Analyt nicht bereits elektrochemisch spezifisch nachweisbar ist,
- d) Absondern des von der ersten Sonde gebundenen Analyten und der von dem Analyten gebundenen ersten Sonde,
- e) Detektion eines durch die abgesonderte erste Sonde oder den ersten Marker verursachten ersten elektrochemischen Signals und eines durch den abgesonderten Analyten oder den zweiten Marker verursachten zweiten elektrochemischen Signals und
- f) Nachweisen, Quantifizieren und/oder Charakterisieren des Analyten mittels eines Verhältnisses zwischen dem ersten und dem zweiten Signal.
- Der Begriff "Analyt" umfasst insbesondere einzel- oder doppelsträngige Nukleinsäuren, Proteine und sonstige Biomoleküle. Bei der ersten oder zweiten Sonde kann es sich um monoklonale oder polyklonale Antikörper, Antikörperfragmente, Rezeptoren, Nukleinsäuren oder Liganden handeln. Unter "Nu-

kleinsäuren" im Sinne dieser Erfindung sind neben DNA und RNA auch Nukleinsäureanaloga wie Peptidnukleinsäuren (PNA) sowie Hybride und Chimäre aus DNA und RNA und Analoga von Nukleinsäuren zu verstehen.

5

"Spezifisch" im Hinblick auf die elektrochemische Nachweisbarkeit bedeutet, dass die erste oder zweite Sonde, der Analyt oder der erste oder zweite Marker jeweils elektrochemisch, d.h. durch eine Redoxreaktion, getrennt voneinander und gegebenenfalls von anderen, z. B. weiteren in der ersten Flüssigkeit enthaltenen, Substanzen nachgewiesen werden können. Das kann durch ein spezifisches Signal möglich sein oder dadurch, dass das Signal in anderer Weise von anderen Signalen, insbesondere auch Hintergrund- oder Störsignalen, differenziert werden kann. Das ist z. B. durch ein differenzielles Ablösen der ersten Sonde und/oder Aufreinigungsprozesse möglich.

Zum spezifischen Nachweisen können die erste und/oder zweite Sonde und/oder der Analyt jeweils durch mindestens einen elektrochemisch nachweisbaren Marker bzw. eine elektrochemisch nachweisbare Markergruppe markiert werden. Durch Markierung mit mehreren Markern bzw. Markergruppen können deutlich intensivere Signale erzeugt werden als mit einem elektrochemisch selbst nachweisbaren Analyten oder einer elektrochemisch selbst nachweisbaren Sonde. Die Sensitivität und die Spezifität des Verfahrens können dadurch erhöht werden. Auch wenn der Analyt oder die Sonde ohne Markierung elektrochemisch nachweisbar sind, wie z. B. Nukleinsäuren, welche eine Purinbase, wie Guanin oder Adenin enthalten, können sie markiert werden. Das Markieren kann dadurch erfolgen, dass ein elektrochemisch nachweisbarer Marker über ein Affinitätsmolekül, z. B. Avidin, an einem an dem Analyten oder der ersten oder der zweiten Sonde angeordneten dazu korrespondierenden Affinitätsmolekül, z. B. Biotin, bindet. Unter einem Affini-

tätsmolekül wird ein Molekül verstanden, welches eine spezifische hohe Affinität zu einem korrespondierenden weiteren Affinitätsmolekül aufweist. Die Markierungsschritte lit. b und lit. c müssen vor Schritt lit. e, können aber jeweils vor  
5 oder nach Schritt lit. a oder lit. d durchgeführt werden.

Die Bindung der zweiten Sonde kann spezifisch oder unspezifisch erfolgen. Bei einem aus Nukleinsäure bestehenden Analyten wird unter einer spezifischen Bindung bevorzugt eine sequenzspezifische Hybridisierung verstanden. Es kann sich da-  
10 bei auch um eine sequenzspezifische Bindung eines Proteins handeln. Die Bindung einer aus Nukleinsäure bestehenden ersten oder zweiten Sonde an einen aus Nukleinsäure bestehenden Analyten kann auch über eine Hoogsteen-Basenpaarung, welche  
15 eine Triplex-Struktur bildet, erfolgen. Dies geschieht bevorzugt bei einer Bindung von PNA an einen aus doppelsträngiger DNA bestehenden Analyten. Als zweite Sonde kann z. B. ein sequenzunabhängig an den Analyten bindender Nukleinsäureindikator, wie ein DNA-Interkalator, dienen.

20 Unter dem Absondern wird ein weitgehendes Trennen der gebundenen von den ungebundenen ersten bzw. zweiten Sonden oder des gebundenen vom ungebundenen Analyten verstanden. Es kann z. B. durch Abbau ungebundener erster oder zweiter Sonden  
25 oder des ungebundenen Analyten oder durch Zentrifugieren, Binden oder Waschen erfolgen. Das Trennen der gebundenen von der ungebundenen ersten Sonde und des von der ersten Sonde gebundenen Analyten von dem ungebundenen Analyten kann auch in einem Schritt erfolgen, z. B. indem der gebildete Komplex  
30 aus Analyt und erster Sonde abzentrifugiert oder gebunden und anschließend gewaschen wird. Beim Waschen wird der Komplex in einer weiteren Flüssigkeit aufgenommen. Die Detektion des ersten und des zweiten Signals kann gleichzeitig oder nacheinander und mit ein und demselben oder verschiedenen elektro-  
35 chemischen Verfahren erfolgen. Die Detektion umfasst gegebene

nenfalls auch ein Quantifizieren der Signale. Das kann auch eine mathematische Operation, insbesondere eine Integration, beinhalten.

- 5 Das wesentliche Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass zwei für den Analyten charakteristische elektrochemische Signale erzeugt werden, die zueinander ins Verhältnis gesetzt werden. Dieses Verhältnis erlaubt spezifische Aussagen über den Analyten, welche durch die bloße Hybridisierung mit nur einer ein Signal erzeugenden Sonde nicht  
10 oder nur mit zusätzlichem Aufwand, wie etwa einer Gelelektrophorese, möglich wären. Das Verfahren ist besonders gut geeignet, um eine Nukleinsäure durch ihre Länge zu charakterisieren. Wird das zweite Signal beispielsweise durch einen  
15 DNA-Interkalator als zweite Sonde verursacht und weist die DNA eine spezifische Bindungsstelle für eine erste Sonde auf, so gibt das Verhältnis des ersten Signals zum zweiten Signal Auskunft über die Länge der Nukleinsäure. Weiterhin kann die Länge von Nukleinsäuren mit sich häufig wiederholenden Sequenzen bspw. dadurch bestimmt werden, dass die erste Sonde  
20 spezifisch an eine nur einmal in dem Molekül vorkommende Sequenz bindet während die zweite Sonde spezifisch an die sich wiederholenden Sequenzen bindet. Das erste Signal kann für das zweite Signal einen internen Standard darstellen, der,  
25 insbesondere wenn ein zu erwartendes erstes Signal bekannt ist, eine Differenzierung eines spezifischen Anteils von einem unspezifischen Anteil des zweiten Signals erlaubt. Dadurch wird eine hohe Sensitivität bzw. Spezifität des Verfahrens erreicht. Unspezifische zweite Signale können z. B.  
30 durch nicht restlos abgesonderte ungebundene zweite Sonden verursacht werden.

- Vorzugsweise wird eine zur Detektion eingesetzte Elektrode nicht mit der ersten Flüssigkeit in Kontakt gebracht. Dadurch  
35 kann die Empfindlichkeit des Verfahrens deutlich erhöht werden.

den, weil in der ersten Flüssigkeit, wie z. B. Blutserum, enthaltene Substanzen dadurch nicht unspezifisch an die Elektrode binden und bei der Detektion unspezifische Signale erzeugen können. Unspezifische Hintergrundsignale können so weitgehend vermieden werden. Erreicht werden kann das beispielsweise indem der Analyt vor dem Schritt lit. e von der ersten Flüssigkeit abgetrennt und in eine zweite Flüssigkeit überführt wird. Bevorzugt wird der Analyt vor Durchführung des Schritts lit. a von der ersten Flüssigkeit abgetrennt und in eine zweite Flüssigkeit überführt. Dadurch können in der ersten Flüssigkeit enthaltene Stoffe abgetrennt werden, die an die erste oder zweite Sonde binden, sie abbauen oder in anderer Hinsicht deren Funktion stören. Weiterhin können Stoffe abgetrennt werden, die bei der Detektion stören. Das können z. B. Stoffe sein, die ein ähnliches elektrochemisches Signal wie die erste oder zweite Sonde erzeugen. Es können auch Stoffe sein, die die Funktion der zur elektrochemischen Detektion verwendeten Elektroden stören. Zum Abtrennen kann der Analyt, insbesondere spezifisch, von einem Fänger-Molekül gebunden werden.

Die Bindung des Analyten an dem Fänger-Molekül kann durch eine, vorzugsweise sequenzspezifische, Hybridisierung erfolgen. Das Fänger-Molekül kann, insbesondere vor dem Binden des Analyten, an einer ersten oder zweiten Oberfläche immobilisiert werden. Dadurch wird das Abtrennen des Analyten von der ersten Flüssigkeit vereinfacht. Durch die Immobilisierung der Fänger-Moleküle kann der Analyt in einem kleinen Volumen angereichert werden. Das erhöht die Nachweisempfindlichkeit des Verfahrens.

Das Fänger-Molekül kann eine Nukleinsäure, ein Analogon einer Nukleinsäure, insbesondere eine Peptidnukleinsäure (PNA), ein Antikörper oder ein Rezeptor sein. Bevorzugt weist das Fänger-Molekül ein Affinitätsmolekül, insbesondere Streptavidin,

Avidin oder Biotin, oder ein biotinyliertes Oligonukleotid auf. Dieses Affinitätsmolekül kann entweder dazu dienen, das Fänger-Molekül an der ersten oder zweiten Oberfläche zu immobilisieren, oder den Analyten zu binden.

5

In einer bevorzugten Ausgestaltung enthält die erste oder zweite Sonde oder der Analyt ein Affinitätsmolekül, insbesondere Biotin, Avidin oder Streptavidin. Die Affinitätsmoleküle sind dabei derart zu wählen, dass es nicht zu Bindungen kommen kann, welche die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens hindern. Insbesondere soll es nicht über die Affinitätsmoleküle zu Bindungen zwischen der ersten und der zweiten Sonde oder zu Bindungen der ersten Sonde an den Analyten kommen. Dadurch ist es auf einfache Weise möglich, den Analyten von der ersten Flüssigkeit abzutrennen. Weiterhin ermöglicht das Affinitätsmolekül ein Binden eines Markers an der ersten oder zweiten Sonde oder dem Analyten oder auch ein Immobilisieren des Analyten. Der Analyt kann eine, insbesondere ein Poly-T-Ende oder ein Poly-A-Ende aufweisende, Nukleinsäure sein. Die Nukleinsäure kann doppel- oder einzelsträngig ausgebildet sein. Auch an eine doppelsträngige Nukleinsäure ist eine sequenzspezifische Bindung, z. B. durch eine Hoogsteen-Bindung einer aus PNA bestehenden ersten oder zweiten Sonde möglich. Das Poly-T-Ende oder das Poly-A-Ende ermöglicht die Bindung des Analyten an eine eine Poly-A-Sequenz oder eine Poly-T-Sequenz aufweisende als Fänger-Molekül dienende Nukleinsäure. Dadurch kann der Analyt leicht aus der Flüssigkeit abgetrennt werden. Weiterhin ermöglicht ein Poly-T-Ende eine Markierung mit mehreren Osmium-Komplexen. In einer besonderen Ausgestaltung des Verfahrens erfolgt das Charakterisieren durch das Bestimmen der Länge der Nukleinsäure.

Bevorzugt wird der Analyt vor oder während Schritt lit. a mittels einer Nukleinsäurevervielfältigungsreaktion, insbesondere einer PCR, vervielfältigt. Das erhöht die Sensitivi-

tät des Verfahrens deutlich. Als Analyt wird dann im Wesentlichen das Produkt der Vervielfältigungsreaktion nachgewiesen, quantifiziert und/oder charakterisiert. Das gilt auch dann, wenn das Produkt wegen der für die Vervielfältigungsreaktion verwendeten Primer nicht völlig mit dem Analyten übereinstimmt oder es sich um ein zu dem Analyten komplementäres Produkt der Vervielfältigungsreaktion handelt. Bei der PCR kann als Primer das Fänger-Molekül oder die erste oder zweite Sonde dienen. Durch die PCR können in den Analyten spezifische Bindungssequenzen eingeführt werden.

Der Analyt kann vor dem Schritt lit. d, insbesondere vor dem Schritt lit. a an der ersten oder zweiten Oberfläche immobilisiert werden. Das kann auch über die Bindung an das Fänger-Molekül erfolgen. Das erleichtert das Abtrennen von der ersten Flüssigkeit und das Absondern gemäß lit. d, das dann z. B. durch Waschen der ersten Oberfläche erfolgen kann. Die erste Oberfläche kann die Oberfläche eines, insbesondere superparamagnetischen, Partikels sein. Ein superparamagnetisches Partikel kann auf einfache Weise mittels eines Magnetfelds abgetrennt werden. Das Partikel kann ansonsten auch durch Zentrifugation abgetrennt werden. Es ermöglicht eine Konzentrierung des Analyten. Weiterhin ist es durch Partikel möglich, eine große Bindungsoberfläche bereitzustellen. Das Partikel weist vorzugsweise einen Durchmesser von 10 nm bis 100  $\mu\text{m}$ , insbesondere 1 bis 10  $\mu\text{m}$ , auf. Diese Partikelgröße ermöglicht es, die Partikel in der Flüssigkeit zu suspendieren und dadurch einen intensiven Kontakt des Analyten mit der ersten und ggf. zweiten Sonde herzustellen.

In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel wird der Analyt vor Durchführung des Schritts lit. a mittels eines Fänger-Moleküls an der ersten Oberfläche immobilisiert. Das Fänger-Molekül kann dabei vor oder nach der Bindung an den Analyten an der ersten Oberfläche immobilisiert werden. Anschließend er-

- folgt ein Waschschrift, bei welchem die erste Flüssigkeit entfernt und durch eine zweite Flüssigkeit ersetzt wird. Die zweite Flüssigkeit kann dabei so gewählt werden, dass optimale Bedingungen für das Binden der ersten oder der ersten und der zweiten Sonde beim Schritt lit. a gegeben sind. Schritt lit. d wird bevorzugt durchgeführt, indem der immobilisierte Analyt mit daran gebundener erster oder erster und zweiter Sonde zum Entfernen der nicht gebundenen ersten bzw. ersten und zweiten Sonde gewaschen wird. Dabei kann die zweite Flüssigkeit durch eine dritte Flüssigkeit ersetzt werden. Die dritte Flüssigkeit ist dabei bevorzugt so gewählt, dass die Detektion gemäß lit. e darin unter optimalen Bedingungen durchgeführt werden kann.
- Vorzugsweise ist die zweite Oberfläche eine zur Detektion dienende, insbesondere einen elektrisch leitfähigen Kunststoff oder ein elektrisch leitfähiges Polymer, Quecksilber, Amalgam, Gold, Platin, Kohlenstoff oder Indium-Zinnoxid enthaltende, Elektrode.
- Bevorzugt weist die zweite Sonde eine spezifische Affinität zu mindestens einer spezifischen zweiten Bindungsstelle des Analyten auf. Aus dem Verhältnis zwischen dem ersten und dem zweiten Signal lässt sich dann eine Information über das Verhältnis der Zahl der ersten zur Zahl der zweiten Bindungsstellen gewinnen. Vorzugsweise weist der Analyt eine bekannte Anzahl erster Bindungsstellen und eine unbekannte Anzahl zweiter Bindungsstellen auf. Das Charakterisieren kann dann in dem Ermitteln der unbekannten Anzahl der zweiten Bindungsstellen durch das Verhältnis von gebundener erster zu gebundener zweiter Sonde bzw. das Verhältnis des ersten Signals zum zweiten Signal erfolgen. Das Signalverhältnis bzw. die Zahl der daraus ermittelten zweiten Bindungsstellen kann mit der Länge des Analyten korreliert werden. Der Analyt kann ein DNA-Fragment sein, welches infolge einer Triplex-Ausdehnungs-



krankheit, wie dem fragilen X-Syndrom, der Huntingtonschen Krankheit, der bulbären Muskelatrophie, der spinozerebellaren Ataxie Typ I, der myotonischen Dystrophie oder der Friedreich Ataxie, repetetive Sequenzen aufweist. Derartige Krankheiten werden üblicherweise über eine Polymerase-Kettenreaktion mit anschließendem Southern-Blot nachgewiesen. Im Verhältnis zum erfindungsgemäßen Verfahren, bei dem die repetetiven Sequenzen als zweite Bindungsstellen dienen können, ist das sehr aufwändig und dauert lange.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die erste Sonde von dem Analyten und/oder der Analyt von der ersten oder zweiten Oberfläche zwischen Schritt lit. d und Schritt lit. e, insbesondere durch Hitzedenaturierung, chemische Denaturierung, enzymatischen Verdau oder chemischen Abbau, freigesetzt. Das Freisetzen von der Oberfläche ermöglicht das Aufkonzentrieren des Analyten oder der ersten Sonde in einem sehr kleinen Flüssigkeitsvolumen und erhöht damit die Sensitivität des Verfahrens. Es ermöglicht ferner einen engen Kontakt der ersten Sonde oder des Analyten mit der zur Detektion eingesetzten Elektrode. Weiterhin ist es somit möglich die Detektion durchzuführen, ohne dass die Elektrode mit der ersten Oberfläche in Kontakt kommt. Dadurch können mögliche Störungen der elektrochemischen Detektion durch die erste Oberfläche vermieden werden. Es können auch Materialien als erste Oberfläche eingesetzt werden, welche die elektrochemische Detektion normalerweise stören würden. Beispielsweise können Streptavidin-beschichtete Partikel als erste Oberfläche und Cystein-markierte PNA als erste Sonde verwendet werden, ohne dass bei der elektrochemischen Detektion der Cystein-Markierung durch die Cystein-Reste des Streptavidins Störungen auftreten können. Weiterhin ist es durch das Freisetzen der ersten Sonde von dem Analyten möglich, das erste und das zweite Signal getrennt voneinander zu detektieren. Dadurch ist die Durchführung des Verfahrens auch möglich, wenn das

erste und das zweite Signal identisch sind, etwa weil es von jeweils identischen Markern verursacht wird.

Es ist auch möglich, die erste und die zweite Sonde von dem Analyten oder die erste Sonde von dem Analyten und den Analyt von der ersten oder zweiten Oberfläche jeweils getrennt voneinander freizusetzen und dann zu detektieren. Auch dadurch ist eine Differenzierung zwischen identischen Signalen nach dem verursachenden Molekül möglich. Weiterhin ist eine Aufkonzentrierung in einem kleinen Flüssigkeitsvolumen möglich.

Alternativ ist es auch möglich, den ersten Marker und/oder den zweiten Marker, insbesondere jeweils getrennt voneinander, von der ersten und/oder zweiten Sonde oder dem Analyten freizusetzen und dann zu detektieren. Das Freisetzen kann durch enzymatischen Verdau oder chemischen Abbau erfolgen. Beispielsweise könnte der erste und/oder der zweite Marker jeweils über eine Nukleinsäuresequenz mit einer spezifischen Restriktionsschnittstelle an die erste oder zweite Sonde oder den Analyten gebunden sein. Ein spezifisches Freisetzen ist dann durch Restriktionsenzyme möglich.

Die erste und/oder zweite Sonde kann eine Nukleinsäure oder ein Analogon einer Nukleinsäure, insbesondere eine Peptidnukleinsäure (PNA), sein. Bevorzugt bindet die erste und/oder zweite Sonde sequenzspezifisch, insbesondere durch Hybridisierung, an den Analyten. Die Sonde kann dabei beispielsweise eine Nukleinsäure sein, welche komplementär zu einer Sequenz des Analyten ist. Bei der Sonde kann es sich aber auch um einen Antikörper handeln, welcher eine bestimmte Aminosäuresequenz in einem aus einem Protein bestehenden Analyten erkennt.

Das erste oder zweite Signal kann jeweils von einer durch den ersten oder zweiten Marker bewirkten katalytischen Wasser-

stofffreisetzung verursacht werden. Bevorzugt ist der erste und/oder der zweite Marker reversibel reduzierbar oder oxidierbar. Der erste oder der zweite Marker kann einen Osmium-Komplex, ein Nanogold-Partikel, eine Cystein-, Ferrocenyl-,  
5 Daunomyzin-, Benzochinon-, Naphthochinon-, Anthrachinon- oder p-Aminophenol-Gruppe oder einen Farbstoff, insbesondere Indophenol, Thiazin oder Phenazin, aufweisen.

Bevorzugt ist die erste oder die zweite Sonde durch mehrere  
10 Marker markiert. Dadurch ist es möglich, eine Sonde für verschiedene elektrochemisch unterschiedlich nachweisbare Analyten zu verwenden. Bevorzugt weist die erste oder zweite Sonde eine lineäre Primärstruktur auf, an deren einem Ende der Marker angeordnet ist. Durch die endständige Anordnung des  
15 Markers wird die Gefahr der Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen der ersten oder der zweiten Sonde mit dem Analyten minimiert.

Die Detektion des ersten und des zweiten Signals kann an derselben Elektrode und/oder durch dasselben elektrochemische  
20 Nachweisverfahren erfolgen. Die Detektion erfolgt vorzugsweise mittels kathodischer Stripping-Voltammetrie (CSV), Rechteckwellen-Voltammetrie, zyklischer Voltammetrie oder Chronopotentiometrie. Die Detektion kann mittels eines reversiblen  
25 Redoxprozesses oder einer katalytischen Wasserstoffentwicklung erfolgen.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. Es zeigen:

30

Fig. 1                    eine schematische Darstellung der Markierung einer ersten Sonde durch Osmiumtetroxid und 2, 2'-Bipyridin,

- Fig. 2a, b      DPV-Voltammogramme zur Bestimmung der Nachweisgrenze,
- 5      Fig. 3a, b, c      schematische Darstellung des Nachweises eines aus Nukleinsäure bestehenden Analyten durch Hybridisierung mit einer Osmium-markierten ersten Sonde,
- 10      Fig. 4      DPV-Voltammogramm zum Nachweis des aus Nukleinsäure bestehenden Analyten durch Hybridisierung mit einer Osmium-markierten ersten Sonde,
- 15      Fig. 5a, b      Voltammogramme einer Chronopotentiometrischen Stripping Analyse (CPSA) zur Bestimmung der Sensitivität von Cystein-PNA-Sonden,
- 20      Fig. 6a - f      schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Verfahrens mit einer ersten und einer zweiten Sonde,
- 25      Fig. 7a - f      schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Verfahrens mit einer sequenzspezifischen ersten und einer sequenzunspezifischen zweiten Sonde,
- 30      Fig. 8a - f      schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Verfahrens, wobei eine erste Sonde und der Analyt zur Erzeugung elektrochemischer Signale verwendet werden und
- 35      Fig. 9a - g      eine schematische Darstellung der Bestimmung der Anzahl von für eine Triplex-Krankheit spezifischen reversiblen Sequenzen.

Um eine Osmium-markierte Sonde herzustellen, ist ein 97mer mit der Sequenz 5-AAA AAA AAA AAA AAA AAA ATT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT C-3 (SEQ ID NO: 1) aus dem anliegenden Sequenzprotokoll mit 2 mmol/l  $\text{OsO}_4$ , 2 mmol/l 2,2'-Bipyridin in 100 mmol/l Tris-HCl, pH 7,0, für 180 Minuten bei 37° C inkubiert worden. Anschließend ist freies  $\text{OsO}_4$  und Bipyridin durch Dialyse gegen entionisiertes Wasser für 5 Stunden entfernt worden. Schematisch ist die Markierung in Fig. 1 dargestellt. Ein Oligonukleotid, mit einer ersten zu einem Bereich eines aus Nukleinsäure bestehenden Analyten komplementären Sequenz 9 und einer zweiten viele Thymin-Reste T enthaltenden Sequenz wird mit Osmiumtetroxid und 2,2'-Bipyridin behandelt. Dabei bilden die Thymin-Reste spezifische osmiumhaltige Komplexe Os, welche sich als elektrochemische Marker nachweisen lassen.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der so hergestellten Sonde werden je 3  $\mu\text{l}$  einer 10, 25, 50, 100, 250 und 500 ng/ml der Osmium-markierten Sonde in Britton Robinson-Puffer (0,04 mol/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,04 mol/l  $\text{H}_3\text{PO}_4$  und 0,04 mol/l  $\text{CH}_3\text{COOH}$  gemischt mit 0,2 mol/l NaOH), pH 3,9 mittels Differenzieller Puls-Voltammetrie (DPV) mit einer Scan-Rate von 10 mV/s, einer Amplitude von 50 mV/s, einer Absorptionszeit von 240 s und einer Scan-Zeit von 120 s bis 240 s vermessen. Das Ergebnis ist dem in Fig. 2 a dargestellten DPV-Voltammogramm zu entnehmen. Die Kurven 36, 38, 40, 42, 44 und 45 entsprechen jeweils 500, 250, 100, 50, 25 oder 10 ng/ml der Osmium-markierten Sonde. Fig. 2 b zeigt ein mit demselben Verfahren mit 3  $\mu\text{l}$  einer 250 pg/ml Osmium-markierte Sonde enthaltenden Lösung erzeugtes DPV-Voltammogramm 46 und ein ohne Sonde erzeugtes DPV-Voltammogramm 47. Die Nachweisgrenze der Osmium-markierten Sonde liegt demnach unter 250 pg/ml. Das entspricht 25 attomol Sonde.

In Fig. 3 a ist ein aus Nukleinsäure bestehender Analyt 10 mit einem Poly-A-Strang  $(A)_n$  an einem Ende, welcher mit einem mit Poly-T  $(T)_n$  als Fänger-Molekül 8 beschichteten Partikel in Kontakt gebracht wird, dargestellt. Der Analyt 10 bindet an das Partikel 18 durch Hybridisierung von  $(A)_n$  mit  $(T)_n$ . Der partikelgebundene Analyt wird mit einer Osmium-markierten ersten Sonde 20 in Kontakt gebracht (Fig. 3 b). Die erste Sonde 20 weist eine zu dem nicht hybridisierten Bereich des Analyten 10 komplementäre Sequenz auf. Unter den gewählten Bedingungen bindet die erste Sonde 20 an den Analyten 10. Ungebundene erste Sonde 20 wird durch Waschen der Partikel entfernt. Anschließend wird die gebundene erste Sonde 20 von dem Analyten 10 durch Hitzebehandlung freigesetzt (Fig. 3 c). Die erste Sonde 20 kann mittels ihrer Osmium-Markierung elektrochemisch detektiert werden.

Der Nachweis kann beispielsweise mit folgenden Komponenten durchgeführt werden:

1. Analyt:

5'-CTT TT CCT TCT CAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA (SEQ ID NO: 2)

2. Sonde I mit komplementärer Sequenz zum Analyten:

5'-TTT TTT TTT TGA GAA GGA AAA AG (SEQ ID NO: 3)

3. Sonde II ohne komplementäre Sequenz zum Analyten:

5'-TTT TTT TTT TAG AGA AAG GGA AA (SEQ ID NO: 4)

Die Thymin-Reste der Sonden I und der zur Kontrolle eingesetzt Sonde II sind mit Osmiumtetroxid und 2,2'-Bipyridin wie oben beschrieben markiert worden.

Zur Immobilisierung des Analyten werden 40 µl superparamagnetische Partikel mit daran immobilisierten Oligo-T-25meren der Firma Dynal, Norwegen zu 40 µl einer 10 µg/ml des Analyten in 0,1 mol/l NaCl, 0,05 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,4 (Inkubationspuffer) enthaltenden Lösung zugesetzt. Die Suspension wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Partikel werden zwei mal in 100 µl Inkubationspuffer gewaschen und in einem Volumen von 40 µl aufgenommen.

10 Zur Hybridisierung des Analyten mit der Sonde werden 40 µl des 400 ng/ml der Sonde enthaltenden Inkubationspuffers zu den Partikeln gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene Sonden werden durch viermaliges Waschen in 100 µl Inkubationspuffer entfernt. Die gebundene  
15 Sonde wird durch Erhitzen auf 85°C freigesetzt und durch Abtrennen des die Sonde enthaltenden Überstands abgesondert. Zur elektrochemischen Detektion der Osmium-markierten Sonde werden 3 µl des Überstands durch DPV mit einer Absorptionszeit von 2 Minuten in Britton-Robinson-Puffer, pH 3,87 analysiert.  
20 Zur Bestimmung einer unspezifischen Bindung wird der Analyt mit der Sonde II in einem separaten Ansatz unter identischen Bedingungen in Kontakt gebracht und Inkubiert.

Das in Fig. 4 dargestellte DPV-Voltammogramm zeigt ein deutliches Signal 48 der Sonde I und ein sehr schwaches Signal 50 der zur Kontrolle eingesetzten Sonde II.

Zur Bestimmung der Sensitivität der Chronopotentiometrischen Stripping Analyse (CSPA) bei Verwendung von Cystein-PNA-Sonden sind verschiedene Konzentrationen von Cystein-PNA (cys-PNA) in 5 mmol/l Phosphatpuffer, pH 7,0 für eine Absorptionszeit von 7 Minuten an einer Elektrode absorbiert worden.  
30 Fig. 5a zeigt ein dann in 0,2 mol/l Ammoniumphosphatpuffer, pH 8,5 bei einem Stripping Strom von -2 µA aufgenommenes DPV-Diagramm mit den Wasserstoff-Peak-Kurven 52, 54 und 56 von  
35

jeweils 0,375, 0,180 und 0,094 ng/ml cys-PNA. Die Nachweisgrenze von cys-PNA lag dabei unter 0,09 ng/ml. Das entspricht 36 attomol cys-PNA in 1  $\mu$ l. Fig. 5b zeigt ein DPV-Diagramm von Brdicka's Signalkurven 58, 60 und 62 von jeweils 0,750, 0,375 und 0,187 ng/ml cys-PNA in 1 mmol/l  $\text{Co}^{3+}$ , 0,1 mol/l Ammoniumphosphatpuffer, pH 9,47. Dabei lag die Nachweisgrenze von cys-PNA unter 0,19 ng/ml.

Fig. 6a - f zeigen eine schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Verfahrens, bei dem eine erste 20 und eine zweite Sonde 22 sequenzspezifisch an den Analyten 10 binden. Fig. 6a zeigt einen Analyten 10 mit einer singulären ersten Bindungsstelle 12 und drei repetitiven zweiten Bindungsstellen 14. Der Analyt 10 wird an einer ersten Oberfläche 16 eines Partikels 18 immobilisiert (Fig. 6b). Der Analyt 10 wird mit der ersten Sonde 20 und der zweiten Sonde 22 in Kontakt gebracht (Fig. 6c). Die erste Sonde 20 weist eine Affinität zur ersten Bindungsstelle 12 und die zweite Sonde 22 eine Affinität zu den zweiten Bindungsstellen 14 auf. Die erste Sonde 20 ist mit einem ersten elektrochemischen Marker 24 und die zweite Sonde 22 mit einem zweiten elektrochemischen Marker 26 markiert.

Unter den gewählten Bedingungen bindet die erste Sonde 20 an die erste Bindungsstelle 12 und die zweite Sonde 22 an die zweiten Bindungsstellen 14 (Fig. 6d). Ungebundene Sonden werden durch Waschen entfernt. Die Sonden werden von dem Analyten freigesetzt und zum Nachweis mit einer zweiten als Elektrode dienenden Oberfläche 27 in Kontakt gebracht (Fig. 6e). Das durch den Marker 24 verursachte Signal Si1 und das durch den Marker 26 verursachte Signal Si2 werden gemessen (Fig. 6f) und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Das Verhältnis von Si2 zu Si1 entspricht dem Verhältnis der Zahl der zweiten Bindungsstellen 14 zur ersten Bindungsstelle 12.



Fig. 7a - f zeigen eine schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens, wobei eine erste Sonde 20 sequenzspezifisch und eine zweite Sonde 22 sequenzunspezifisch an den Analyten 10 bindet.

5

Fig. 7a zeigt einen Analyten 10, welcher eine singuläre erste Bindungsstelle 12 aufweist. Der Analyt 10 wird an einer ersten Oberfläche 16 eines Partikels 18 immobilisiert

(Fig. 7b). Der Analyt 10 wird mit den ersten Sonden 20 und zweiten Sonden 22 in Kontakt gebracht (Fig. 7c). Die erste Sonde 20 weist eine Bindungsaffinität zur ersten Bindungsstelle 12 auf. Die zweite Sonde 22 weist eine sequenzunspezifische Affinität zu dem Analyten 10 auf. Die zweite Sonde 22 kann beispielsweise ein DNA-Interkalator sein. Die erste Sonde 20 ist durch einen ersten elektrochemischen Marker 24 und die zweite Sonde 22 durch einen zweiten elektrochemischen Marker 26 markiert.

Unter den gewählten Bedingungen binden die erste Sonde 20 und die zweite Sonde 22 an den Analyten 10 (Fig. 7d). Ungebundene erste 20 und zweite Sonde 22 werden durch Waschen entfernt. Gebundene erste 20 und die zweite Sonde 22 werden von dem Analyten freigesetzt und mit einer zweiten als Nachweiselektrode dienenden Oberfläche 27 in Kontakt gebracht (Fig. 7e).

25

Das durch den Marker 24 verursachte erste Signal Si1 und das durch den Marker 26 verursachte zweite Signal Si2 werden gemessen (Fig. 7f) und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Das Verhältnis entspricht dem Verhältnis der ersten Bindungsstelle 12 zu der Gesamtlänge des Analyten 10.

30

In Fig. 8a ist ein aus Nukleinsäure bestehender Analyt 10 mit einer singulären ersten Bindungsstelle 12 und einer bestimmten Anzahl von Guanin-Resten G dargestellt. Der Analyt 10 wird an einer ersten Oberfläche 16 eines Partikels 18 immobi-

35

lisiert (Fig. 8b). Er wird mit einer ersten Sonde 20, welche mit einem elektrochemischen Marker 24 markiert ist und eine spezifische Affinität zu der ersten Bindungsstelle 12 aufweist, in Kontakt gebracht (Fig. 8c). Unter den gewählten Bedingungen bindet die erste Sonde 20 an die erste Bindungsstelle 12 (Fig. 8d). Ungebundene erste Sonde 20 wird durch Waschen entfernt. An den Analyten 10 gebundene erste Sonde 20 und die Guanin-Reste G werden von bzw. aus dem Analyten 10, z. B. durch saure Hydrolyse, freigesetzt und mit einer zweiten als Nachweis-Elektrode dienenden Oberfläche 27 in Kontakt gebracht (Fig. 8e). Das durch G erzeugte Signal Si1 und das durch den Marker 24 erzeugte Signal Si2 werden gemessen (Fig. 8f) und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Das Verhältnis der Signale Si1 zu Si2 entspricht dem Zahlenverhältnis der ersten Bindungsstelle 12 zu der Gesamtanzahl an G in dem Analyten 10.

In Fig. 9a ist ein doppelsträngiges DNA-Fragment 11, welches eine unbekannte Anzahl von für eine Triplex-Krankheit spezifischen repetitiven je eine zweite Bindungsstelle 14 enthaltende Sequenzen und eine singuläre eine erste Bindungsstelle 12 enthaltende Sequenz aufweist. Das DNA-Fragment wird mit einem ersten, an seinem 5'-Ende einen Poly-A-Anteil pA aufweisenden Primer 28 und einem zweiten Primer 30 in Kontakt gebracht. Die ersten 28 und zweiten Primer 30 binden an jeweils einen DNA-Strang des DNA-Fragments 11 und rahmen dabei die zweiten Bindungsstellen 14 und die erste Bindungsstelle 12 ein (Fig. 9b).

Durch eine Vervielfältigungsreaktion wird ein Amplifikationsprodukt 32 erzeugt, welches die zweiten Bindungsstellen 14 und die erste Bindungsstelle 12 sowie den Poly-A-Anteil an einem 5'-Ende enthält (Fig. 9c). Das Amplifikationsprodukts 32 wird durch Denaturierung von seinem Gegenstrang 33 getrennt und mit einem eine Poly-T-Sonde als Fänger-Molekül pT

aufweisenden superparamagnetischen Partikel 18 in Kontakt gebracht. Dabei bindet der Poly-A-Anteil pA spezifisch an die Poly-T-Sonde pT (Fig. 9d).

- 5 Das an das Partikel 18 gebundene Amplifikationsprodukt 32 wird mit einer ersten Sonde 20, welche eine spezifische Affinität zu der ersten Bindungsstelle 12 aufweist und einer zweiten Sonde 22, welche eine spezifische Affinität zu den zweiten Bindungsstellen 14 aufweist, in Kontakt gebracht. Die  
10 erste Sonde 20 ist mit einem elektrochemischen Marker 24 und die zweite Sonde 22 mit einem elektrochemischen Marker 26 markiert (Fig. 9e).

- Unter den gewählten Bedingungen bindet die erste Sonde 20 an  
15 die erste Bindungsstelle 12 und die zweite Sonde 22 an die zweiten Bindungsstellen 14 (Fig. 9f). Der Überschuss an ungebundener erster 20 und zweiter Sonde 22 wird durch Waschen entfernt.

- 20 Gebundene erste 20 und zweite Sonden 22 werden von dem Amplifikationsprodukt 32 freigesetzt und mit einer Nachweiselektrode 27 in Kontakt gebracht (Fig. 9g). Durch die Marker 24 und 26 verursachte elektrochemische Signale werden getrennt voneinander erfasst. Die Anzahl der repetitiven Sequenzen  
25 wird aus dem Verhältnis der durch die Marker 24 und 26 erzeugten Signale ermittelt. Das Verfahren ist somit zum Nachweisen und Identifizieren einer Triplex-Krankheit geeignet.

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweisen, Quantifizieren und/oder Charakterisieren eines in einer ersten Flüssigkeit enthaltenen Analyten (10) mit folgenden Schritten:

a) Inkontaktbringen und Inkubieren des Analyten (10) mit jeweils einer eine Affinität zu dem Analyten (10) aufweisenden ersten (20) und zweiten Sonde (22), wobei die Affinität der ersten Sonde (20) durch eine spezifische Affinität zu mindestens einer ersten Bindungsstelle (12) des Analyten (10) bewirkt wird und das Inkubieren unter Bedingungen erfolgt, unter denen die erste (20) und die zweite Sonde (22) an den Analyten (10) binden,

b) Markieren der ersten Sonde (20) durch mindestens einen elektrochemisch spezifisch nachweisbaren ersten Marker (24), zumindest wenn sie nicht bereits elektrochemisch spezifisch nachweisbar ist,

c) Markieren der zweiten Sonde (22) durch mindestens einen elektrochemisch spezifisch nachweisbaren zweiten Marker (26), zumindest wenn sie nicht bereits elektrochemisch spezifisch nachweisbar ist,

d) Absondern der an den Analyten (10) gebundenen ersten (20) und zweiten Sonde (22),

e) Detektion eines durch die abgesonderte erste Sonde (20) oder den ersten Marker (24) verursachten ersten elektrochemischen Signals (Si1) und eines durch die abgesonderte zweite Sonde (22) oder den zweiten Marker (26) verursachten zweiten elektrochemischen Signals (Si2) und

f) Nachweisen, Quantifizieren und/oder Charakterisieren des Analyten (10) mittels eines Verhältnisses zwischen dem ersten ( $Si1$ ) und dem zweiten Signal ( $Si2$ ).

5 2. Verfahren zum Nachweisen, Quantifizieren und/oder Charakterisieren eines in einer ersten Flüssigkeit enthaltenen Analyten (10) mit folgenden Schritten:

10 a) Inkontaktbringen und Inkubieren des Analyten (10) mit jeweils einer Affinität zu dem Analyten (10) aufweisenden ersten Sonde (20), wobei die Affinität der ersten Sonde (20) durch eine spezifische Affinität zu mindestens einer ersten Bindungsstelle (12) des Analyten (10) bewirkt wird und das Inkubieren unter Bedingungen erfolgt, unter denen die erste  
15 Sonde (20) an den Analyten (10) bindet,

b) Markieren der ersten Sonde (20) durch mindestens einen elektrochemisch spezifisch nachweisbaren ersten Marker (24), zumindest wenn sie nicht bereits elektrochemisch spezifisch  
20 nachweisbar ist,

c) Markieren des Analyten (10) durch mindestens einen elektrochemisch spezifisch nachweisbaren zweiten Marker (26), zumindest wenn der Analyt (10) nicht bereits elektrochemisch  
25 spezifisch nachweisbar ist,

d) Absondern des von der ersten Sonde (20) gebundenen Analyten (10) und der von dem Analyten (10) gebundenen ersten Sonde (20),  
30

e) Detektion eines durch die abgesonderte erste Sonde (20) oder den ersten Marker (24) verursachten ersten elektrochemischen Signals ( $Si1$ ) und eines durch den abgesonderten Analyten (10) oder den zweiten Marker (26) verursachten zweiten  
35 elektrochemischen Signals ( $Si2$ ) und

f) Nachweisen, Quantifizieren und/oder Charakterisieren des Analyten (10) mittels eines Verhältnisses zwischen dem ersten ( $S_{i1}$ ) und dem zweiten Signal ( $S_{i2}$ ).

5 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei eine zur Detektion eingesetzte Elektrode (27) nicht mit der ersten Flüssigkeit in Kontakt gebracht wird.

10 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Analyt (10) vor dem Schritt lit. e, insbesondere vor dem Schritt lit. a, von der ersten Flüssigkeit abgetrennt und in eine zweite Flüssigkeit überführt wird.

15 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Analyt (10), insbesondere spezifisch, von einem Fänger-Molekül ( $pT$ ,  $(T)_n$ ) gebunden wird.

20 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Fänger-Molekül ( $pT$ ,  $(T)_n$ ) an einer ersten (16) oder zweiten Oberfläche immobilisiert wird.

25 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Fänger-Molekül ( $pT$ ,  $(T)_n$ ) eine Nukleinsäure, ein Analogon einer Nukleinsäure, insbesondere eine Peptidnukleinsäure (PNA), ein Antikörper oder ein Rezeptor ist.

30 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Fänger-Molekül ( $pT$ ,  $(T)_n$ ) ein Affinitätsmolekül, insbesondere Streptavidin, Avidin oder Biotin, oder ein biotinyliertes Oligonukleotid aufweist.

35 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die erste (20) oder zweite Sonde (22) oder der Analyt (10) ein Affinitätsmolekül, insbesondere Biotin, Avidin oder Streptavidin, enthält.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Analyt (10) eine, insbesondere ein poly-T-Ende (pT, (T)<sub>n</sub>) oder ein poly-A-Ende (pA, (A)<sub>n</sub>) aufweisende, Nukleinsäure ist.

5

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Charakterisieren durch das Bestimmen der Länge der Nukleinsäure erfolgt.

10

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Analyt (10) vor oder während Schritt lit. a mittels einer Nukleinsäurevervielfältigungsreaktion, insbesondere einer PCR, vervielfältigt wird.

15

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Analyt (10) vor dem Schritt lit. d, insbesondere vor dem Schritt lit. a, an der ersten (16) oder zweiten Oberfläche immobilisiert wird.

20

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die erste Oberfläche (16) die Oberfläche eines, insbesondere superparamagnetischen, Partikels (18) ist.

25

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei das Partikel (18) einen Durchmesser von 10 nm bis 100 µm, insbesondere 1 - 10 µm, aufweist.

30

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die zweite Oberfläche eine zur Detektion dienende, insbesondere einen elektrisch leitfähigen Kunststoff oder ein elektrisch leitfähiges Polymer, Quecksilber, Amalgam, Gold, Platin, Kohlenstoff oder Indium-Zinnoxid enthaltende, Elektrode (27) ist.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die zweite Sonde (22) eine spezifische Affinität zu mindestens einer spezifischen zweiten Bindungsstelle (14) des Analyten (10) aufweist.

5

18. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, wobei der Analyt (10) eine bekannte Anzahl erster Bindungsstellen (12) und eine unbekannte Anzahl zweiter Bindungsstellen (14) aufweist.

10

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Analyt (10) ein DNA-Fragment ist, welches infolge einer Triplex-Ausdehnungskrankheit, wie dem fragilen X-Syndrom, der Huntingtonschen Krankheit, der bulbären Muskelatrophie, der spinozerebellaren Ataxie Typ I, der myotonischen Dystrophie oder der Friedreich Ataxie, repetetive Sequenzen aufweist.

15

20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die erste Sonde (20) von dem Analyten (10) und/oder der Analyt (10) von der ersten (16) oder zweiten Oberfläche zwischen Schritt lit. d und Schritt lit. e, insbesondere durch Hitze-denaturierung, chemische Denaturierung, enzymatischen Verdau oder chemischen Abbau, freigesetzt wird.

20

21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die erste (20) und die zweite Sonde (22) von dem Analyten (10) oder die erste Sonde (20) von dem Analyten (10) und der Analyt (10) von der ersten (16) oder zweiten Oberfläche jeweils getrennt voneinander freigesetzt und dann detektiert werden.

25

30

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der erste Marker (24) und/oder der zweite Marker (26), insbesondere jeweils getrennt voneinander, von der ersten (20)



und/oder zweiten Sonde (22) oder dem Analyten (10) freigesetzt und dann detektiert werden.

23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
5 der erste (24) und/oder der zweite Marker (26) durch enzymatischen Verdau oder chemischen Abbau freigesetzt werden.

24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
10 die erste (20) und/oder zweite Sonde (22) eine Nukleinsäure oder ein Analogon einer Nukleinsäure, insbesondere eine Peptidnukleinsäure (PNA), ist.

25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
15 die erste (20) und/oder zweite Sonde (22) sequenzspezifisch, insbesondere durch Hybridisierung, an den Analyten (10) bindet.

26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
20 das erste (Si1) oder zweite Signal (Si2) jeweils von einer durch den ersten (24) oder zweiten Marker (26) bewirkten katalytischen Wasserstofffreisetzung verursacht wird.

27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
25 der erste (24) und/oder der zweite Marker (26) reversibel reduzierbar oder oxidierbar ist.

28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
30 der erste (24) oder zweite Marker (26) einen Osmium-Komplex, ein Nanogold-Partikel, eine Cystein-, Ferrocenyl-, Daunomycin-, Benzochinon-, Naphthochinon-, Anthrachinon- oder p-Aminophenol-Gruppe oder einen Farbstoff, insbesondere Indophenol, Thiazin oder Phenazin, aufweist.

29. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die erste (20) oder zweite Sonde (22) durch mehrere Marker (24, 26) markiert ist.
- 5 30. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die erste (20) oder zweite Sonde (22) eine lineare Primärstruktur aufweist, an deren einem Ende der Marker (24, 26) angeordnet ist.
- 10 31. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Detektion des ersten (Si1) und des zweiten Signals (Si2) an derselben Elektrode und/oder durch dasselbe elektrochemische Nachweisverfahren erfolgt.
- 15 32. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Detektion mittels kathodischer Stripping Voltammetrie (CSV), Rechteckwellen-Voltammetrie, zyklischer Voltammetrie oder Chronopotentiometrie erfolgt.
- 20 33. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Detektion mittels eines reversiblen Redoxprozesses oder einer katalytischen Wasserstoffentwicklung erfolgt.

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> november Aktiengesellschaft Gesellschaft für Molekulare Medizin

5 <120> Verfahren zum Nachweisen, Quantifizieren und/oder  
Charakterisieren eines Analyten

<130> 432623EH

10 <140>  
<141>

<160> 4

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 97

<212> DNA

20 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Willkürliche  
Sequenz

25

<400> 1

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aattcttctt cttcttcttc ttcttcttct tcttcttctt 60  
cttcttcttc ttcttcttct tcttcttctt cttcttc 97

30

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

35

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Willkürliche  
Sequenz

5 <400> 2

cttttccttc tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa

32

<210> 3

10 <211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

15 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Willkürliche  
Sequenz

<400> 3

ttttttttttt gagaaggaaa aag

23

20

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

25 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Willkürliche  
Sequenz

30

<400> 4

ttttttttttt agagaaaggg aaa

23

1/12

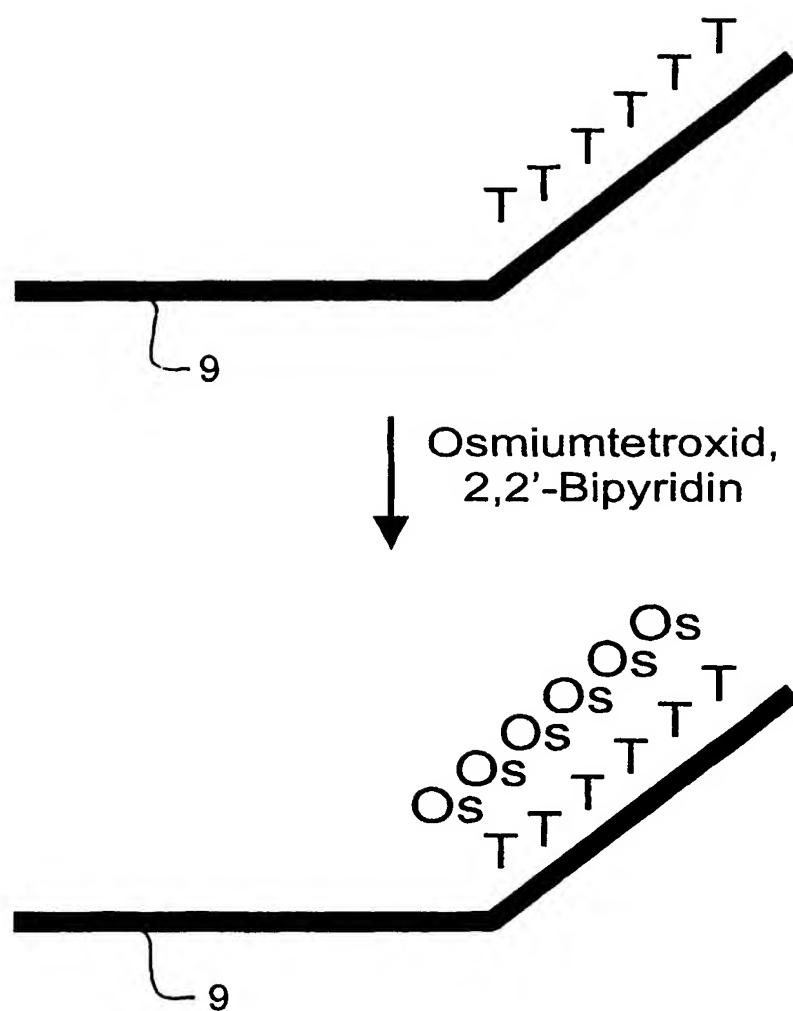


Fig. 1

2/12

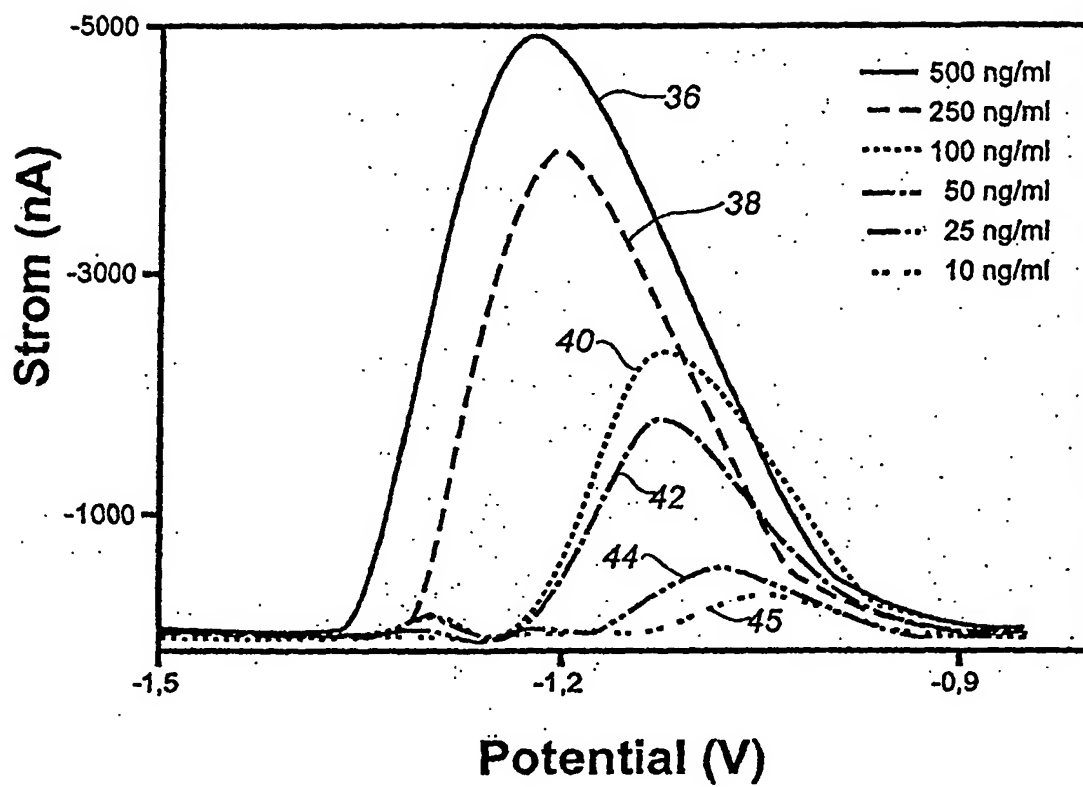


Fig. 2a

3/12

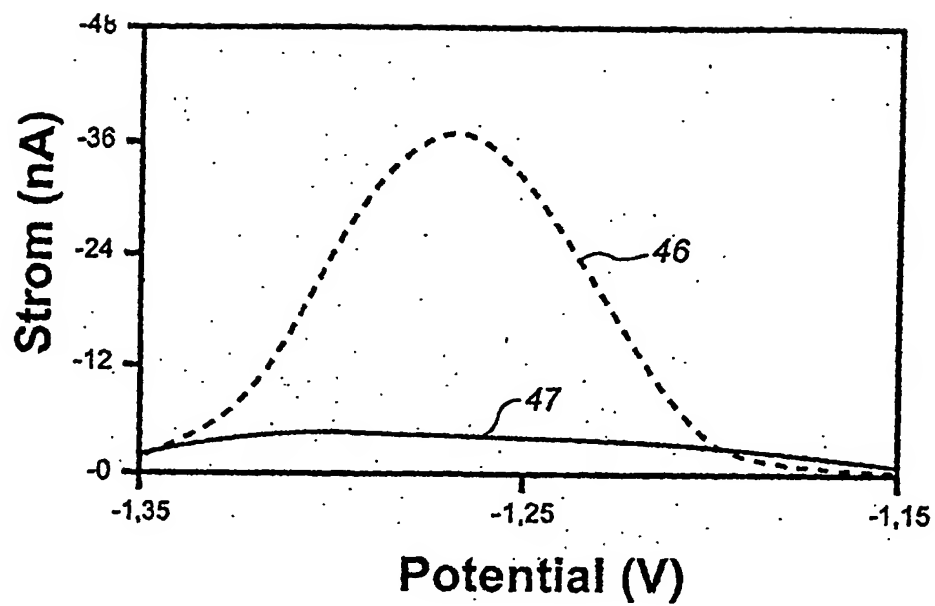


Fig. 2b

4/12

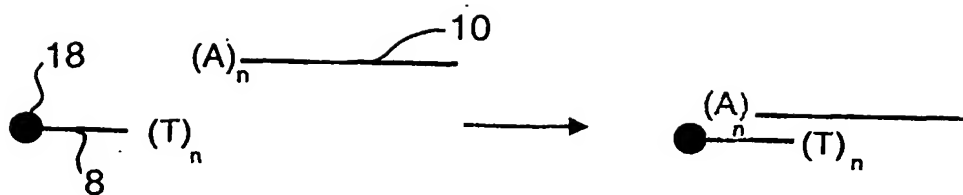


Fig. 3a

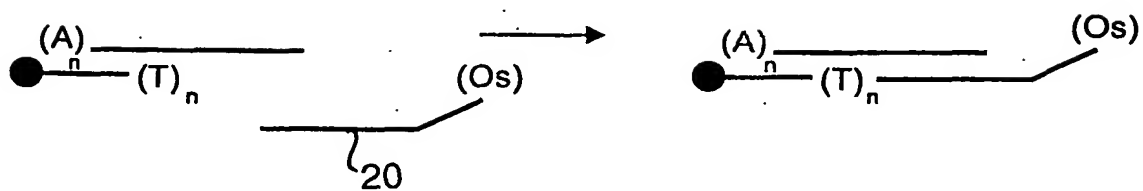


Fig. 3b

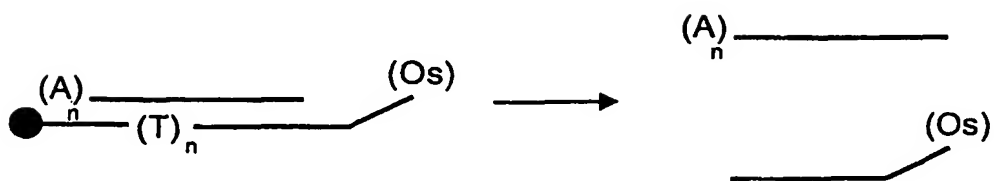


Fig. 3c



5/12

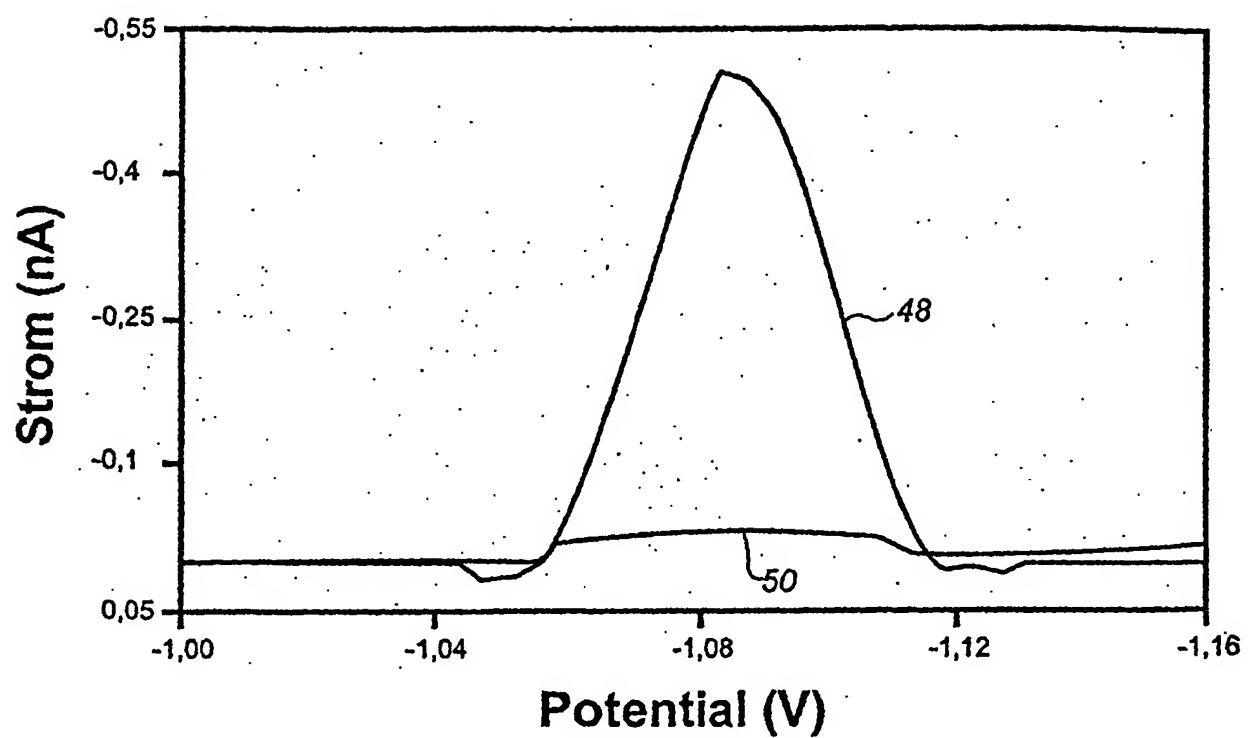


Fig. 4

6/12

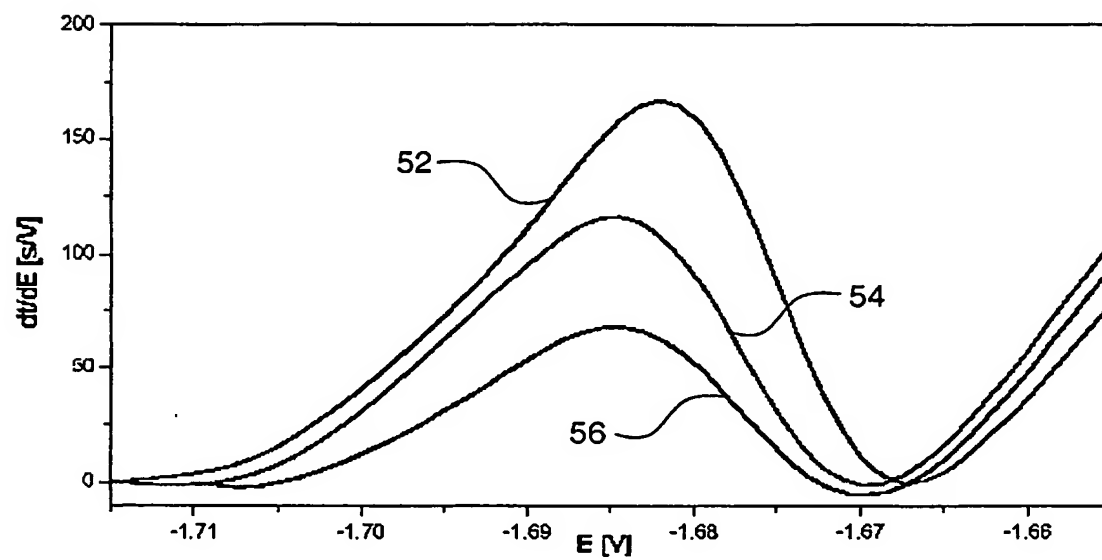


Fig. 5a

7/12

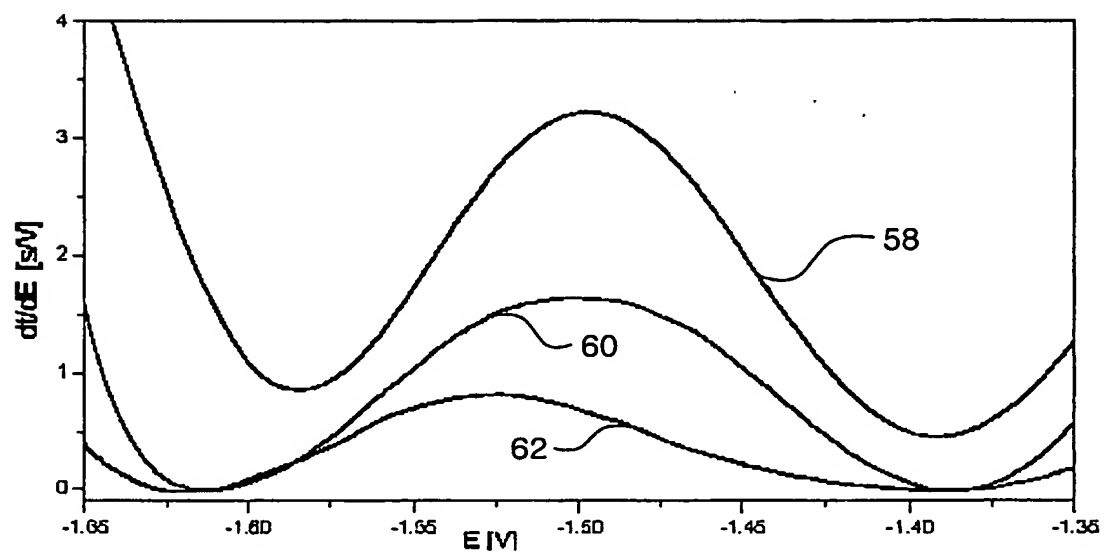
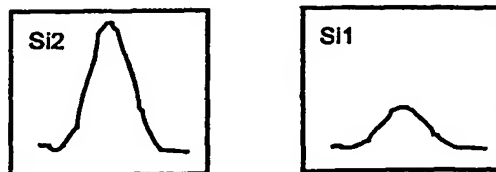
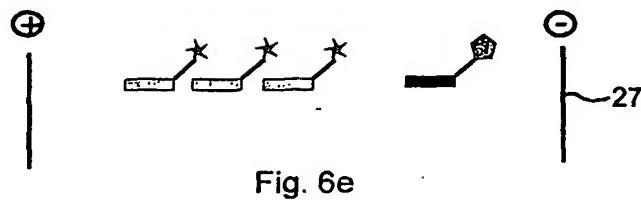
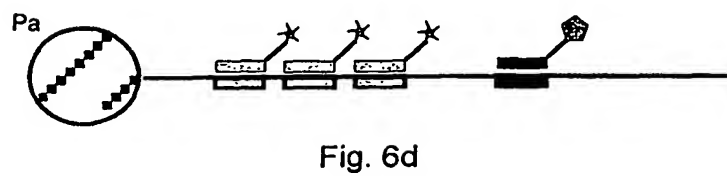
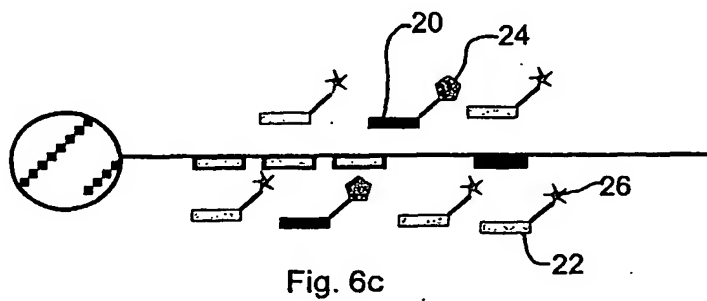
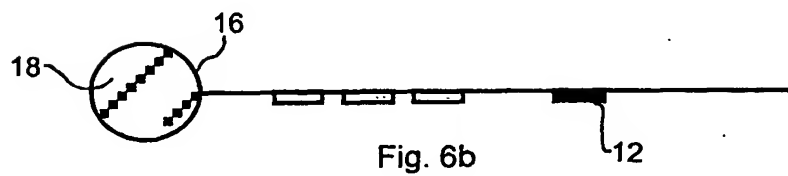
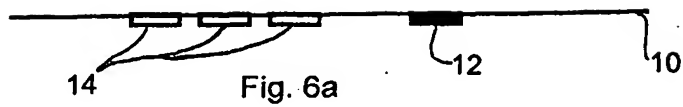


Fig. 5b

8/12



9/12

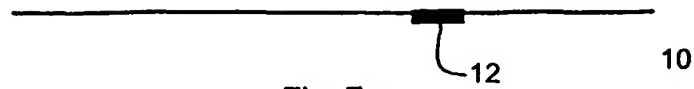


Fig. 7a



Fig. 7b

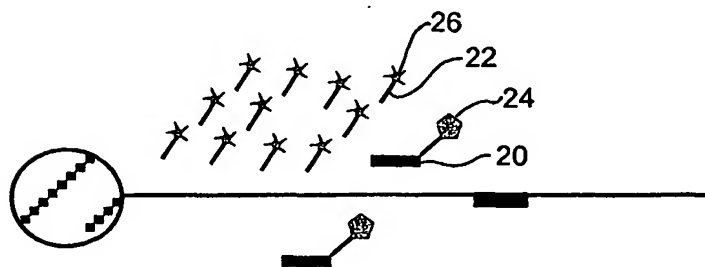


Fig. 7c

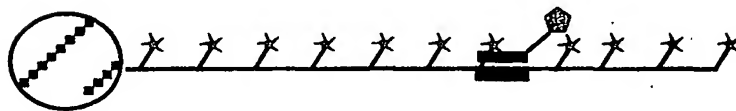


Fig. 7d

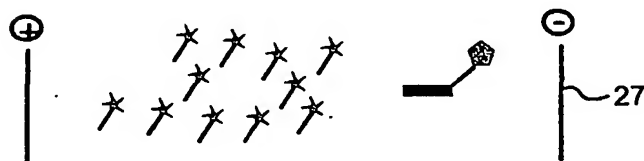


Fig. 7e

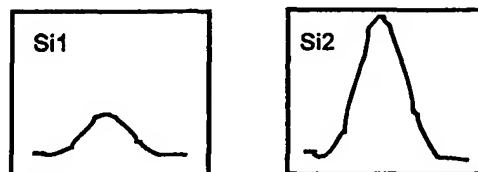


Fig. 7f

10/12

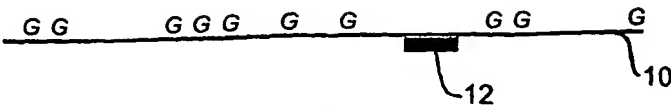


Fig. 8a

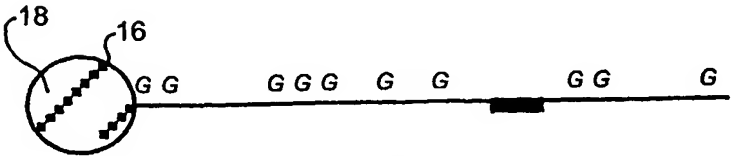


Fig. 8b

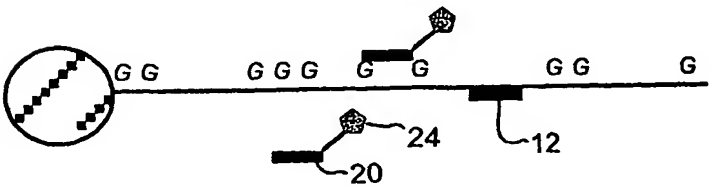


Fig. 8c

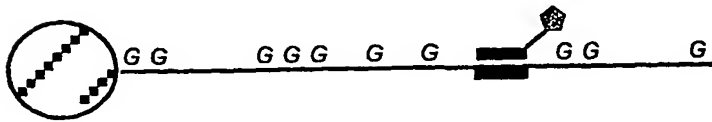


Fig. 8d

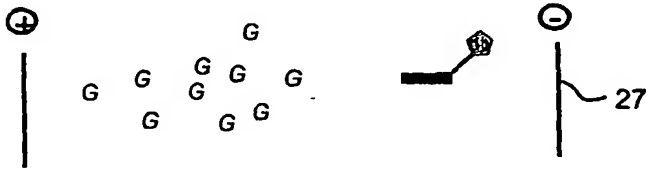


Fig. 8e

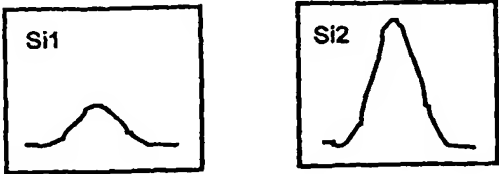
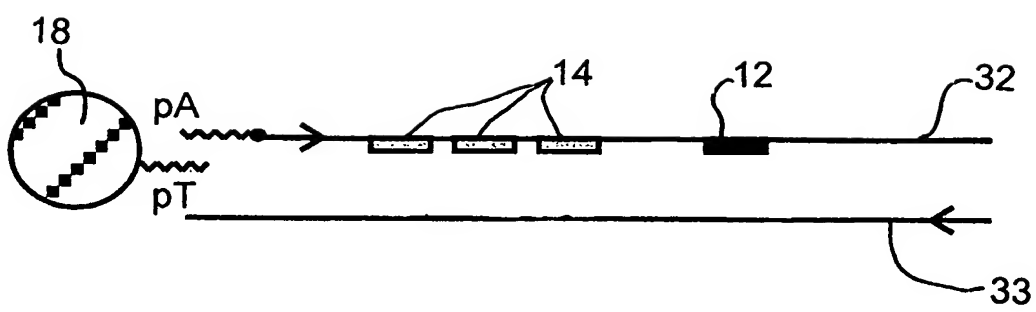
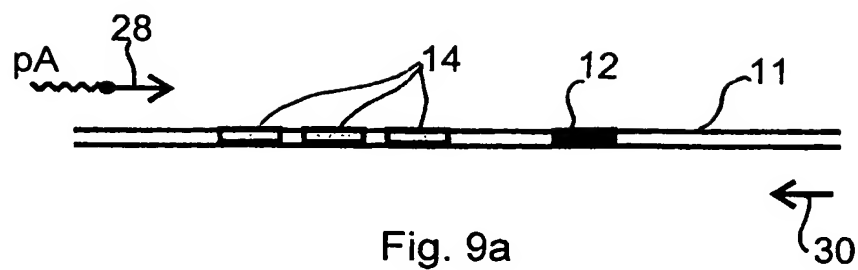


Fig. 8f

11/12



12/12

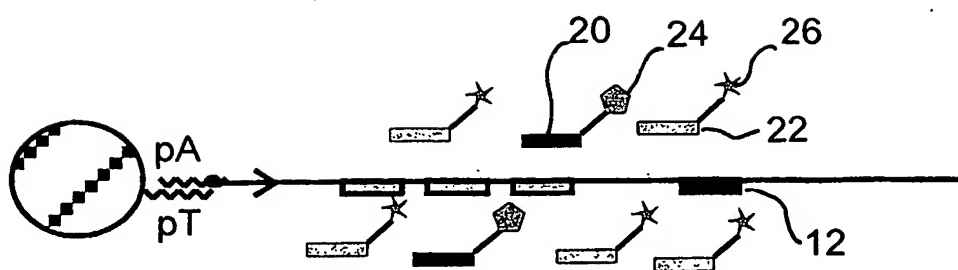


Fig. 9e

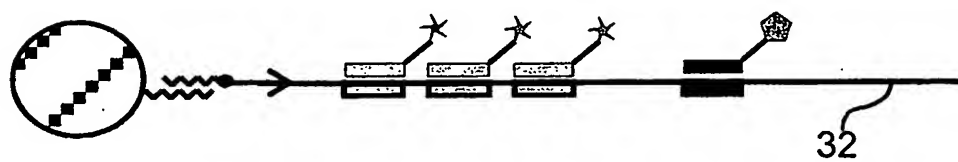


Fig. 9f

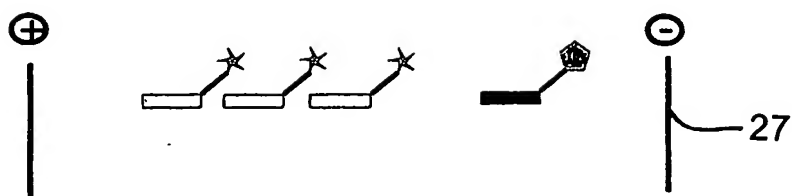


Fig. 9g



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/02202

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 346 387 B1 (GROELKE JOHN W ET AL) 12 February 2002 (2002-02-12) column 6 -column 12 column 14 -column 16 column 23 claims 1-29	1-13, 16-33
Y	---	14, 15
Y	US 6 078 782 A (NAMBA YUZABURO ET AL) 20 June 2000 (2000-06-20) column 7 -column 12 ---	14, 15
	-/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 December 2003

Date of mailing of the international search report

22/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan-2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

BROCHADO GARGANTA, M

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/02202

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	PALECEK E ET AL: "DNA HYBRIDIZATION AT MICROBEADS WITH CATHODIC STRIPPING VOLTAMMETRIC DETECTION" TALANTA, ELMSFORD, NY, US, vol. 56, no. 5, 1 April 2002 (2002-04-01), pages 919-930, XP001122239 page 920 -page 924 page 928 -page 929 figures 1,2,4,6 ----	1-33
P,X	PALECEK E ET AL: "New approaches in the development of DNA sensors: hybridization and electrochemical detection of DNA and RNA at two different surfaces" BIOELECTROCHEMISTRY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 56, no. 1-2, May 2002 (2002-05), pages 85-90, XP002228420 ISSN: 1567-5394 page 86 -page 89 ----	1-33
P,X	DE 101 06 654 A (NOVEMBER AG GES FUER MOLEKULAR) 5 September 2002 (2002-09-05) page 1-4 ----	1-33
A	WO 01 94943 A (BERTLING WOLF ;HOEFNER GEORG (DE); WANNER KLAUS (DE); NOVEMBER AG) 13 December 2001 (2001-12-13) the whole document ----	1-33
A	US 6 306 584 B1 (BAMDAD CYNTHIA C) 23 October 2001 (2001-10-23) the whole document -----	1-33

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/02202

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6346387	B1	12-02-2002	US 6361951 B1 26-03-2002
			US 6132971 A 27-10-1998
			US 5871918 A 16-02-1999
			US 6180346 B1 30-01-2001
			AU 7191901 A 03-06-2002
			WO 0242771 A2 30-05-2002
			US 2002037530 A1 28-03-2002
			US 2002106683 A1 08-08-2002
			US 6127127 A 03-10-2000
			AT 223498 T 15-09-2002
			AU 724600 B2 28-09-2000
			AU 6337696 A 30-01-1997
			CA 2225935 A1 16-01-1997
			CN 1192249 A 02-09-1998
			DE 69623494 D1 10-10-2002
			DE 69623494 T2 17-04-2003
			DK 871773 T3 09-12-2002
			EP 1193315 A1 03-04-2002
			EP 0871773 A2 21-10-1998
			JP 2000501601 T 15-02-2000
			NO 976057 A 24-02-1998
			NZ 311955 A 29-04-1999
			WO 9701646 A2 16-01-1997
			US 6387625 B1 14-05-2002
			US 5968745 A 19-10-1999
			AU 2983500 A 04-10-2000
			CA 2366866 A1 21-09-2000
			CN 1343260 T 03-04-2002
			EP 1161560 A1 12-12-2001
			JP 2002539462 T 19-11-2002
			NO 20014429 A 09-11-2001
			NZ 513604 A 28-03-2003
			WO 0055366 A1 21-09-2000
US 6078782	A	20-06-2000	US 5935779 A 10-08-1999
			US 6325973 B1 04-12-2001
			US 5779976 A 14-07-1998
			US 5962218 A 05-10-1999
			AT 173542 T 15-12-1998
			AU 668085 B2 26-04-1996
			AU 1420692 A 07-09-1992
			AU 1530492 A 07-09-1992
			CA 2103674 A1 07-08-1992
			CN 1065339 A ,B 14-10-1992
			CN 1064945 A ,B 30-09-1992
			DE 69227624 D1 24-12-1998
			DE 69227624 T2 08-07-1999
			DK 570518 T3 02-08-1999
			EP 1286164 A2 26-02-2003
			EP 0570518 A1 24-11-1993
			EP 0877252 A2 11-11-1998
			ES 2126591 T3 01-04-1999
			GR 3029446 T3 28-05-1999
			HK 1017970 A1 11-08-2000
			IE 920380 A1 12-08-1992
			IE 920381 A1 12-08-1992
			IL 100866 A 31-10-1995
			IL 100867 A 08-12-1995

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/02202

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6078782	A		JP 3182515 B2	03-07-2001
			JP 11148901 A	02-06-1999
			JP 3128541 B2	29-01-2001
			JP 11125601 A	11-05-1999
			JP 3061416 B2	10-07-2000
			JP 6509412 T	20-10-1994
			JP 3013937 B2	28-02-2000
			JP 6508203 T	14-09-1994
			KR 226231 B1	15-10-1999
			NZ 241537 A	25-06-1993
			NZ 241538 A	25-02-1993
			WO 9214138 A1	20-08-1992
			WO 9214139 A1	20-08-1992
			US 5635347 A	03-06-1997
			US 2003008339 A1	09-01-2003
			US 5705402 A	06-01-1998
			US 6448091 B1	10-09-2002
			US 5770459 A	23-06-1998
			US 5746974 A	05-05-1998
			US 5798083 A	25-08-1998
			ZA 9200803 A	25-11-1992
			ZA 9200804 A	30-12-1992
			AT 180057 T	15-05-1999
			AU 637775 B2	10-06-1993
			AU 4635789 A	28-05-1990
			CA 2002101 A1	03-05-1990
DE 10106654	A	05-09-2002	DE 10106654 A1	05-09-2002
			DE 10290517 D2	11-12-2003
			WO 02064823 A2	22-08-2002
WO 0194943	A	13-12-2001	DE 10028186 A1	19-09-2002
			AU 6894401 A	17-12-2001
			WO 0194943 A2	13-12-2001
			EP 1325328 A2	09-07-2003
US 6306584	B1	23-10-2001	AU 5926598 A	07-08-1998
			EP 0981643 A2	01-03-2000
			WO 9831839 A2	23-07-1998

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/02202

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 6 346 387 B1 (GROELKE JOHN W ET AL) 12. Februar 2002 (2002-02-12) Spalte 6 -Spalte 12 Spalte 14 -Spalte 16 Spalte 23 Ansprüche 1-29	1-13, 16-33
Y	---	14, 15
Y	US 6 078 782 A (NAMBA YUZABURO ET AL) 20. Juni 2000 (2000-06-20) Spalte 7 -Spalte 12 ---	14, 15
	--- -/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. Dezember 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

22/12/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

BROCHADO GARGANTA, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	PALECEK E ET AL: "DNA HYBRIDIZATION AT MICROBEADS WITH CATHODIC STRIPPING VOLTAMMETRIC DETECTION" TALANTA, ELMSFORD,NY, US, Bd. 56, Nr. 5, 1. April 2002 (2002-04-01), Seiten 919-930, XP001122239 Seite 920 -Seite 924 Seite 928 -Seite 929 Abbildungen 1,2,4,6 ----	1-33
P,X	PALECEK E ET AL: "New approaches in the development of DNA sensors: hybridization and electrochemical detection of DNA and RNA at two different surfaces" BIOELECTROCHEMISTRY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 56, Nr. 1-2, Mai 2002 (2002-05), Seiten 85-90, XP002228420 ISSN: 1567-5394 Seite 86 -Seite 89 ----	1-33
P,X	DE 101 06 654 A (NOVEMBER AG GES FUER MOLEKULAR) 5. September 2002 (2002-09-05) Seite 1-4 ----	1-33
A	WO 01 94943 A (BERTLING WOLF ;HOEFNER GEORG (DE); WANNER KLAUS (DE); NOVEMBER AG) 13. Dezember 2001. (2001-12-13) das ganze Dokument ----	1-33
A	US 6 306 584 B1 (BAMDAD CYNTHIA C) 23. Oktober 2001 (2001-10-23) das ganze Dokument -----	1-33

# INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/02202

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6346387	B1	12-02-2002	US 6361951 B1 26-03-2002
			US 6132971 A 27-10-1998
			US 5871918 A 16-02-1999
			US 6180346 B1 30-01-2001
			AU 7191901 A 03-06-2002
			WO 0242771 A2 30-05-2002
			US 2002037530 A1 28-03-2002
			US 2002106683 A1 08-08-2002
			US 6127127 A 03-10-2000
			AT 223498 T 15-09-2002
			AU 724600 B2 28-09-2000
			AU 6337696 A 30-01-1997
			CA 2225935 A1 16-01-1997
			CN 1192249 A 02-09-1998
			DE 69623494 D1 10-10-2002
			DE 69623494 T2 17-04-2003
			DK 871773 T3 09-12-2002
			EP 1193315 A1 03-04-2002
			EP 0871773 A2 21-10-1998
			JP 2000501601 T 15-02-2000
			NO 976057 A 24-02-1998
			NZ 311955 A 29-04-1999
			WO 9701646 A2 16-01-1997
			US 6387625 B1 14-05-2002
			US 5968745 A 19-10-1999
			AU 2983500 A 04-10-2000
			CA 2366866 A1 21-09-2000
			CN 1343260 T 03-04-2002
			EP 1161560 A1 12-12-2001
			JP 2002539462 T 19-11-2002
			NO 20014429 A 09-11-2001
			NZ 513604 A 28-03-2003
			WO 0055366 A1 21-09-2000
US 6078782	A	20-06-2000	US 5935779 A 10-08-1999
			US 6325973 B1 04-12-2001
			US 5779976 A 14-07-1998
			US 5962218 A 05-10-1999
			AT 173542 T 15-12-1998
			AU 668085 B2 26-04-1996
			AU 1420692 A 07-09-1992
			AU 1530492 A 07-09-1992
			CA 2103674 A1 07-08-1992
			CN 1065339 A ,B 14-10-1992
			CN 1064945 A ,B 30-09-1992
			DE 69227624 D1 24-12-1998
			DE 69227624 T2 08-07-1999
			DK 570518 T3 02-08-1999
			EP 1286164 A2 26-02-2003
			EP 0570518 A1 24-11-1993
			EP 0877252 A2 11-11-1998
			ES 2126591 T3 01-04-1999
			GR 3029446 T3 28-05-1999
			HK 1017970 A1 11-08-2000
			IE 920380 A1 12-08-1992
			IE 920381 A1 12-08-1992
			IL 100866 A 31-10-1995
			IL 100867 A 08-12-1995

# INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/02202

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung	
US 6078782	A	JP 3182515 B2	03-07-2001	
		JP 11148901 A	02-06-1999	
		JP 3128541 B2	29-01-2001	
		JP 11125601 A	11-05-1999	
		JP 3061416 B2	10-07-2000	
		JP 6509412 T	20-10-1994	
		JP 3013937 B2	28-02-2000	
		JP 6508203 T	14-09-1994	
		KR 226231 B1	15-10-1999	
		NZ 241537 A	25-06-1993	
		NZ 241538 A	25-02-1993	
		WO 9214138 A1	20-08-1992	
		WO 9214139 A1	20-08-1992	
		US 5635347 A	03-06-1997	
		US 2003008339 A1	09-01-2003	
		US 5705402 A	06-01-1998	
		US 6448091 B1	10-09-2002	
		US 5770459 A	23-06-1998	
		US 5746974 A	05-05-1998	
		US 5798083 A	25-08-1998	
		ZA 9200803 A	25-11-1992	
		ZA 9200804 A	30-12-1992	
		AT 180057 T	15-05-1999	
		AU 637775 B2	10-06-1993	
		AU 4635789 A	28-05-1990	
		CA 2002101 A1	03-05-1990	
		DE 10106654	A	05-09-2002
DE 10290517 D2	11-12-2003			
WO 02064823 A2	22-08-2002			
WO 0194943	A	13-12-2001	DE 10028186 A1	19-09-2002
			AU 6894401 A	17-12-2001
			WO 0194943 A2	13-12-2001
			EP 1325328 A2	09-07-2003
US 6306584	B1	23-10-2001	AU 5926598 A	07-08-1998
			EP 0981643 A2	01-03-2000
			WO 9831839 A2	23-07-1998



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**